

陣内逸郎(佐賀県)昭和28年7月4日生

授与年月日 平成2年3月31日

主論文 In vitro growth response to G-CSF and GM-CSF by bone marrow cells of patients with acute myeloid leukemia

#### 論文内容の要旨

##### 緒言

Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) と granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) は顆粒球・マクロファージの産生を調節する造血因子である。最近、それらの遺伝子がクローニングされ、組み換え型のものが量産され、臨床応用が可能となった。すでに癌患者で抗がん剤使用後に投与され、顆粒球減少の程度の軽減ならびに減少からの回復が認められている。一方、両CSFは骨髄性の白血病細胞を刺激する可能性があるため臨床応用には問題があるとされている。本研究では骨髄細胞の培養法を用いて、急性骨髄性白血病(AML)患者の両CSFに対する白血病細胞のin vitroでの反応性を検討し、その症例の病態及び臨床面との関連について考察した。

##### 対象及び方法

未治療のAML患者18例より骨髄細胞もしくは末梢血を採取し、以下の実験を行った。半固形培養はメチルセルロース法で行い、細胞 $2.5 \times 10^4$ 個/wellに両CSFを単独または両者を添加、もしくはCSF無添加で7日から10日培養し、コロニー数を算定し、両CSFの白血病幹細胞に対する刺激をみた。一部では個々の

コロニーの構成細胞の形態、染色体を検索した。液体培養は細胞 $2.5 \times 10^5$ 個/mlで行い経時的に生細胞数、細胞の形態をみ、両CSFの細胞増殖および分化誘導に対する効果を検討した。CSFの添加濃度は正常の顆粒球幹細胞を最大刺激する量、G-CSF 10ng/ml, GM-CSF 250pmol/lとし、一部の例では種々の濃度のCSFを添加し用量に対する反応性をみた。

### 結 果

1. コロニー形成は18例中14例にみられた。その中で4例はCSF無添加でコロニー形成があり、臨床的には化学療法に低抗性であった。他の10例ではCSF添加によりコロニー形成がみられたが、両CSFのコロニー刺激能には症例間に差が見られた。しかし、急性前骨髄球性白血病 (APL) では3例全例に同じ傾向を認めた。すなわち、CSF無添加ではコロニー形成は見られず、G-CSF添加では1wellあたり122~196個のクラスター (20個以下の細胞からなる集塊) と少数の大型コロニー (数百個の細胞からなる) の明らかに異なる二種類のコロニーが見られた。GM-CSFではクラスターのみ形成され、その数は6~28個であった。

2. 液体培養における各症例の両CSFによる細胞数の増加はコロニー形成の結果とほぼ同じパターンであった。M2の2例ではG-CSFとGM-CSFは細胞数を増加させ、培養細胞の形態はG-CSFで約50%, GM-CSFでは約30%が成熟好中球であり、それらはペルオキシダーゼ欠損の異常を示した。しかし、CSF無添加で細胞数の増加はみられなかったものの培養細胞の30%は成熟好中球であった。その他の例では培養により顕著な成熟好中球の増加はみられなかった。

3. APLの骨髄細胞をG-CSFで8日間液体培養後に、半固形培養に移しコロニー形成をみたところ、3例ともクラスター形成は著減し、少数の大型コロニーのみみられた。GM-CSFの場合は一次培養で形成された数とほぼ同数のクラスター及び大型コロニーがみられた。骨髄細胞をG-CSFで72時間液体培養後の染色体分析では、分裂像はすべてt(15;17)を示し、白血病クローン由来の細胞が増殖していることを示した。しかし、大型コロニーの染色体分析を行ったところ、すべて (15コロニー, 25分裂像) 正常核型で、正常クローン由来と考えられた。

### 考 案

G-CSFは、APL症例の骨髄細胞の白血病細胞を刺激すると同時に残存する正常の顆粒球の増殖も刺激したが、その白血病細胞増殖刺激作用は一過性で、白血病幹細胞の生存は維持しなかった。一方、GM-CSFはAPL細胞とその幹細胞の生存を維持し、両CSFのAPL細胞に対する作用は異なっていた。両CSFの白血病細胞に対する分化誘導能の有無について検討した

が、分化するか否かは白血病細胞自体の性格に基づき、分化傾向にある場合にCSFはそれを増幅すると考えられた。AML患者へのCSFの投与は白血病細胞の増殖が刺激されることにより問題があると思われる。しかし、CSFの作用を白血病細胞に対するものと正常顆粒球に対するものとに区別して検討し、また白血病細胞の分化をみてもみると、AMLの一部では顆粒球減少に伴う感染症を合併した場合にはCSFの臨床応用も期待できるのではないかと考えられた。

### 結 語

G-CSFとGM-CSFは約80%のAML患者の白血病細胞に影響を与え、特にAPLでは両CSFは白血病細胞の増殖を刺激するが、G-CSFはAPL白血病幹細胞の生存を維持せず、GM-CSFは維持することを明らかにした。AML患者に対するCSFの臨床応用につき考案した。

### 論文審査の結果の要旨

陣内逸郎は昭和54年3月、長崎大学医学部を卒業した後、昭和54年5月医師国家試験に合格、昭和54年7月より長崎大学医学部附属病院原研内科にて、昭和55年6月より長崎県立市民病院にて臨床研修を行った。昭和56年6月より長崎大学医学部原研内科医員として、昭和57年3月より放射線医学総合研究所障害臨床部に在職し研究生として、昭和59年4月より原研内科医員として、昭和59年8月より日赤長崎原爆病院に勤務、研究生として、昭和61年6月より原研内科助手 (文部教官) として市丸道人教授の指導のもとに内科学、血液学の研究を行った。

平成元年8月、主論文「In vitro growth response to G-CSF and GM-CSF by bone marrow cells of patients with acute myeloid leukemia」を完成し、参考論文2編を付して長崎大学医学部研究科委員会に医学博士の学位の審査を申請した。

長崎大学医学部研究科委員会はこれを平成2年2月7日の定例委員会に付議し、論文内容の要旨を検討し、研究経歴を審査した結果、受理しても差し支えないものと認めたので上記の審査委員を選定した。委員は主査を中心として慎重に審査し、3月20日の定例委員会で結果を報告した。

主論文は急性骨髄性白血病患者18例を対象とし、これより得られたコロニー (幹細胞) や液体培養の細胞に対する造血利因子、G-CSFとGM-CSFの影響を検討したものである。半固形培養はメチルセルロース法で行い、また経時期に細胞の増殖状態、形態などをみるために液体培養を行った。又液体培養後、細胞を半固形培養に移してコロニー形成を観察した。

その結果、18例中14例にコロニー形成があり、4例はCSF無添加でコロニー形成がみられ、これらの例は

治療抵抗性であった。急性前骨髄球性白血病 (APL) 3例で G-CSF で122—196コのクラスターと少数の大型コロニーがみられ GM-CSF ではクラスターのみがみられた。又 M2 の例では白血病細胞の分化を増幅させた。半固形培養に培養を移した実験では G-CSF の場合クラスター形成は著減したが GM-CSF はある程度クラスター形成を維持した。クラスターは白血病幹細胞に由来し、大型コロニーは正常幹細胞に由来することが染色体分析から推測できた。

これらの成績は CSF が白血病細胞の増殖を刺激するが、G-CSF は白血病幹細胞の生存を維持しないと考えられた。以上の結果は AML 患者に対する CSF の臨床応用に有用な資料であると考えられた。

医学研究科委員会は審査委員の報告に基づき、これを討論に付して審議した結果、本論文の医学とくに血液学の臨床に貢献する所大であり、学位に位するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	市 丸 道 人
	副 査	教 授	珠 玖 洋
	副 査	教 授	辻 芳 郎